

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 9 月 16 日 (16.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/078952 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 1/20, C08J 11/10 // C08L 75:00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002691

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 3 日 (03.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-055421 2003 年 3 月 3 日 (03.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県
川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 神戸 敏明
(KAMBE, Toshiaki) [JP/JP]; 〒3050044 茨城県つくば
市並木 2 丁目 2 0 8 - 3 0 1 Ibaraki (JP). 茂野 ゆき
枝 (SHIGENO, Yukie) [JP/JP]; 〒3002647 茨城県つく
ば市手子生浦山 1 1 0 8 - 2 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL FUNGUS CAPABLE OF BREAKING URETHANE BOND

(54) 発明の名称: 新規ウレタン結合分解菌

(57) Abstract: Methods of plastic disposal preferred from the viewpoint of natural environment include a biodegradation method using microorganisms. In this connection, there is a problem that plastics are generally not biodegradable. The invention provides a microorganism capable of decomposing urethane compounds and a method of decomposing urethane compounds by the use of the microorganism. In particular, there are provided a microorganism capable of decomposing urethane compounds as raw materials of polyurethanes and a method of decomposing polyurethanes by the use of the microorganism.

(57) 要約: プラスチックの処理方法として自然環境の点から好ましいものに微生物を利用した生分解法があるが、プラスチックは一般に生分解性ではないという問題を有する。本発明は、ウレタン化合物を分解することのできる微生物、および該微生物を用いたウレタン化合物の分解方法を提供する。特に、ポリウレタンの原料となるウレタン化合物を分解することのできる微生物および該微生物を用いたポリウレタンの分解方法を提供することを目的とする。

WO 2004/078952 A1

明細書
新規ウレタン結合分解菌

技術分野

- 5 本発明は、新規な微生物、および該微生物を用いる生物学的処理法によるポリウレタンの分解方法に関する。

背景技術

- 10 近年、プラスチック廃棄物の処理が問題になっている。プラスチック廃棄物の処理方法としては焼却や埋め立てが主であるが、焼却は地球温暖化の促進、埋め立ては埋立地の減少等の問題を抱えている。例えばポリウレタンは、全世界で年間約600万t、国内では約55万tが消費されている。このうち、その発泡緩衝体は断熱性に優れることから冷蔵庫等の断熱材として大量に利用されている。現在、このポリウレタン廃棄物は不燃ゴミとして埋め立て処分される場合が多い
- 15 が処分場の不足ならびに環境汚染の問題が生じている。一方、自然環境の点から好ましいものに微生物を利用した生分解法があるが、ポリウレタンは生分解性ではないという問題を有する。

- 20 ポリウレタンは分子内にウレタン結合及びエステル結合またはエーテル結合を含み、それらの結合が切断されることによって分解が進む。ポリオール部分のエステル結合はカビや細菌によって切断されるという報告が数例ある。Darby (Darby R. T. and Kaplan A. M. : Appl. Microbiol. , 16, 900-905 (1968)) らはカビによる種々のポリウレタン分解試験を行い、エーテル系よりもエステル系ポリウレタンの方が分解を受け易いことや、イソシアネートやポリオールの種類によって分解特性が異なることを報告している。Kay (Kay, M. J. , McCabe, R. W. , Morton, L. H. G. : Int. Biodeterio. Biodegrad. , 31, 209-225 (1991).) らはエステル系ポリウレタン分解菌として15種類の菌を単離し、分解力の強かったコリネバクテリウム (Corynebacterium) 属菌について分解特性を検討した結果について報

告している。

しかし、ポリウレタン中のウレタン結合の分解に関する知見はほとんどない。微生物分解に伴って、ウレタン結合が加水分解を受けているという報告は幾つかあるが、ウレタン結合の切断と微生物との因果関係は明らかでない (B. Jansen et al., Zentralbl Bakteriologie, 276, 36 (1991), Darby R. T. and Kaplan A. M.: Appl. Microbiology, 16, 900-905 (1968))。

一方、低分子のウレタン化合物が微生物によって分解されることはすでに報告されており、その分解はエステラーゼによるものであることが知られている。しかし、そのほとんどは酒類の品種改良やカルバメート系農薬の分解浄化に関するものであり (特開平01-300892、特開平01-240179、特開平02-128689、特開平03-175985、特開平04-104784、特開平04-325079)、ポリウレタンの分解に利用できる技術ではない。ポリウレタン原料となりうる物質の分解菌としてはカビによるものが報告されているが (特開平09-192633)、大量培養が容易な細菌によるものはない。

固体ポリウレタンの分解菌としては、ポリエステル型のポリウレタン分解菌としてペニバチルスアミロリチカスTB-13株 (特願平2002-334162) およびコマモナスアシドボランス (Comamonas acidovorans) TB-35株 (T. Nakajima-Kambe, F. Onuma, N. Kimpura and T. Nakahara, Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiology Letters, Vol. 129, 39-42, 1995) が知られているが、これらの分解菌はウレタン中のエステル結合は分解するが、ウレタン結合はほとんど分解しない。従って、ポリウレタンの細菌による完全分解のために、ウレタン結合を分解する細菌の取得が望まれている。

発明の開示

本発明は、ウレタン化合物を分解することのできる新規微生物、および該微生物を用いたウレタン化合物の分解方法を提供することを目的とする。特に、ポリウレタンの原料となるウレタン化合物を分解することのできる微生物および該微生物を用いたポリウレタンの分解方法を提供することを目的とする。

この問題を解決するため、我々はポリウレタン合成原料として用いられる低分子量ウレタン化合物を分解する微生物のスクリーニングを行い、ロドコッカス（*Rhodococcus*）属に属する微生物が該ウレタン化合物を分解できることを見出した。尚、ロドコッカス属に属する微生物がウレタン化合物の分解能を有することはこれまで知られていなかった。また、本発明者らはロドコッカス属に属する微生物を用いるポリウレタンの分解方法を見出した。

即ち、本発明はウレタン化合物、特にポリウレタン合成原料として用いられる低分子量ウレタン化合物を分解する能力を有するロドコッカス属に属する微生物を提供するものであり、また、ロドコッカス属に属する微生物を用いたポリウレタンの分解方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、ウレタン結合分解菌のスクリーニングに使用した合成ウレタン化合物の構造を示す。

図2は、rDNA塩基配列に基づいて求めた既知の菌種との系統樹を示す。

図3は、各培養条件におけるウレタン化合物I残存量の測定結果を示す。

図4は、各培養条件におけるジアミン生成量の測定結果を示す。

図5は、各培養条件における菌体生育量測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

上述のように本発明は、ウレタン化合物、特にポリウレタン合成原料として用いられる低分子量ウレタン化合物を分解する能力を有するロドコッカス属に属する微生物を提供するものであり、また、ロドコッカス属に属する微生物を用いたポリウレタンの分解方法を提供するものである。

ロドコッカス属に属し、ウレタン化合物分解能を有する微生物は、既に公知の微生物であってもよく、新たにスクリーニングされた微生物であってもよい。微生物のスクリーニングの一例を示せば、各地より採取した土壌をポリウレタン合成原料として用いられる低分子量ウレタン化合物を含む培地の入った試験管に入れ、30℃にて振とう培養し、一週間ごとに植え継ぎを繰り返した後、培養液中に白濁や変色が認められたサンプルについて、培養上清をNB平板に希釈塗布し、30℃で1～3日培養後、生育してきたコロニーをピックアップし、ウレタン結合分解菌の候補菌株とする。それから、得られた候補株を、トルエンジイソシアネートとブタノールを反応させて得た低分子量ウレタン化合物（ウレタン化合物 I）を炭素源として含んだ液体培地にて培養し、培養液中にウレタン化合物 I のウレタン結合加水分解産物であるトルエンジアミンの生成が確認された菌を取得することにより行うことができる。

本発明の微生物は、ウレタン結合を有する化合物を分解する能力を有するロドコッカス属菌であればよい。具体的には、代表例として、2003年2月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託申請し、寄託を拒否されたロドコッカス エクイ (*Rhodococcus equi*) TB-60株であって、2004年1月24日付けでドイツの特許生物寄託機関であるDSMZドイツ微生物・細胞培養収集所（ドイツ連邦共和国D-38124ブラウンシュウィグ マッシュェローデルウェグ 1b）に国際寄託されたロドコッカス エクイ TB-60-DSMZ 16175が挙げられる。ロドコッカス属菌の菌学的性質は、バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー（*BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*）（第1巻1984年、第2巻1986年、第3巻1989年、第4巻1989年）に記載されている。

更に本発明の微生物は、ウレタン結合を分解する能力を有するロドコッカス属菌であれば、野生株、変異株のいずれでも良い。

変異株は、従来からよく用いられている変異剤であるエチルメタンスルホン酸による変異処理、ニトロソグアニジン、メチルメタンスルホン酸などの他の化学物質処理、紫外線照射、或いは変異剤処理なしで得られる、いわゆる自然突然変

異によって取得することも可能である。

ロドコッカス属に属する微生物の培養に用いる培地としては、ロドコッカス属に属する微生物が生育できる培地であれば特に制限なく用いることができ、例えば、LB培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の微生物の生育に使用する培地は、具体的には、本発明の微生物が資化し得る炭素源、例えばグルコース等、及び本発明の微生物が資化し得る窒素源を含有し、窒素源としては有機窒素源、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー等、無機窒素源、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等を含有することができる。さらに所望により、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン等の陽イオンと硫酸イオン、塩素イオン、リン酸イオン等の陰イオンとからなる塩類を含んでもよい。さらに、ビタミン類、核酸類等の微量要素を含有することもできる。炭素源の濃度は、例えば0.1~10%程度であり、窒素源の濃度は、種類により異なるが、例えば0.01~5%程度である。また、無機塩類の濃度は、例えば0.001~1%程度である。

本発明において分解できるウレタン化合物は、分子構造中にウレタン結合を有するものであればよい。制限的でない例としては、トルエン-2,4-カルバミン酸ジブチルエステル、トルエン-2,6-ジカルバミン酸ジブチルエステル、メチレンビスフェニルジカルバミン酸ジブチルエステル、ヘキサメチレン-ジカルバミン酸ジブチルエステル、ノルボルネンジカルバミン酸ジブチルエステルおよびそれらを合成原料とするポリウレタンが挙げられる。

ポリウレタンとは、分子中にウレタン結合（ -NHCOO- ）を有する高分子化合物の総称で、多官能イソシアネートとヒドロキシル基含有化合物との反応により得られ、エステル、エーテル、アミド、ウレア、カルバメートなどの基を有するポリマーである。ヒドロキシル基もしくはイソシアネート基の官能性数を変化させることで多種多様の分岐あるいは架橋ポリマーを調製することができる。用いるポリオールの種類によってエステル系とエーテル系に大別できる。ポリウレタンは、易加工性、耐腐敗性、耐変質性、低比重等の優れた特性により、弾性体、発泡体、接着剤、塗料、繊維、合成皮革など幅広い用途を持っており、自動車部

品としても広く使用されている。本発明の分解方法において適用し得るポリウレタン樹脂の数平均分子量は、特に制限はない。

更に本発明は、ウレタン結合を有する化合物を微生物の作用により分解処理する方法を提供する。該方法は、微生物の増殖過程でウレタン結合が分解され栄養源として消費されることを利用する、あるいは微生物の有する酵素の作用によりウレタン結合を分解する作用を利用するもの、すなわち増殖した後の微生物菌体、例えば休止菌体を利用するものである。あるいは、菌体を常法により凍結乾燥した粉末状の、あるいはその粉末と各種ビタミンやミネラル、必要な栄養源、例えば酵母エキス、カザミノ酸、ペプトン等を配合した後に打錠した錠剤等固形状の形態の調製物としてウレタン化合物の処理に提供しても良い。また、菌株を活性汚泥およびコンポストの成分として利用することもできる。

分解に供されるウレタン化合物は、例えば液体の培地中にエマルジョンとして、あるいは粉体の形で加えても良いし、フィルム、ペレット等の塊として加えても良い。なお、培地に対するウレタン化合物の投入量は、0.01～10重量%が望ましい。添加する微生物量は極少量であってもよいが、分解効率を考慮してウレタン化合物に対して0.1重量%以上（湿重量）が好ましい。また、分解に供するウレタン化合物は、1種類であっても複数種類であっても良い。

微生物の増殖過程でウレタン結合が分解され栄養源として消費されることを利用する態様では、ウレタン化合物を単一の炭素源として、あるいは単一の炭素・窒素源として与えることも、他の炭素源、窒素源とともに与えることもできる。使用し得る培地としては、炭素源としては、ウレタン化合物あるいはグルコース等、及び本発明の微生物が資化し得る窒素源を含有し、窒素源としては有機窒素源、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー等、無機窒素源、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等を含有することができる。さらに所望により、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン等の陽イオンと硫酸イオン、塩素イオン、リン酸イオン等の陰イオンとからなる無類を含んでもよい。さらに、ビタミン類、核酸類等の微量要素を含有することもできる。炭素源の濃度は、例えば0.1～10%程度であり、窒素源の濃度は、種類により異なるが、例えば0.01～5%程度である。ま

た、無機塩類の濃度は、例えば0.001～1%程度である。

微生物の有する酵素のウレタン結合を分解する作用を利用する態様、すなわち増殖した後の微生物菌体、例えば休止菌体を利用する態様では、ウレタン結合の分解に際し、該微生物の増殖を伴わないため、緩衝液にウレタン化合物を添加した培地などであっても良いが、その他に窒素源、無機塩、ビタミンなどを添加しても良い。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液が挙げられる。

ウレタン化合物の分解に要する時間は、分解に供するウレタン化合物の種類、組成、形状及び量、使用した微生物の種類及びウレタン化合物に対する相対量、その他種々の培養条件等に応じて変化する。

10 本発明において、上記微生物に対し、好気条件で、静置培養、振盪培養あるいは通気培養を行えばウレタン化合物の分解がみられる。好ましくは回転振盪培養が良く、回転数は30～250回転/分の範囲であるのが良い。培養条件としては、培養温度は10～50℃、特に30℃付近が好ましい。また、培地のpHは4～10の範囲、好ましくは7付近であるのが良い。

15 培地中のウレタン化合物の分解の確認は、例えば、分解に供したウレタン化合物の重量減少の測定、残存ウレタン化合物量の高速液体クロマトグラフィ（HPLC）による測定、あるいはウレタン結合加水分解産物であるジアミン化合物の生成の測定により確認することができる。ジアミン化合物の生成の確認は、例えば薄層クロマトグラフィにて生成が予想されるジアミン化合物を標準物質として用いることにより、またはガスクロマトグラフィにより行うことができる。

20 固体ポリウレタンの分解方法の一態様として、ポリエステル型のポリウレタンのエステル結合分解菌として知られるペニバチルスアミロリチカスTB-13株（受託番号FERM P-19104、特願平2002-334162参照）および／またはコマモナスアシドボランスTB-35株と、ウレタン結合分解能を有する本発明の菌を用いることにより、ポリウレタンの完全分解を行うことができる。

実施例

本発明を実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

実施例 1 ウレタン結合分解菌のスクリーニング

ウレタン化合物の合成方法

分解菌のスクリーニングには、合成したウレタン化合物を使用した（図 1）。これらの化合物は、トルエンジイソシアネート（TDI）、メチレンビスフェニルジイソシアネート（MDI）、ヘキサメチレンジイソシアネート（HDI）、ノルボルネンジイソシアネート（NBDI）などポリウレタンの工業原料として用いられる代表的な 5 種類のイソシアネートとブタノールを反応させ、ウレタン化したものである。これらの化合物（ウレタン化合物 I～V、図 1 参照）はいずれも分子内にウレタン結合を有する物質で、常温では固体で、水に対して不溶であった。

培地

分解菌のスクリーニングには、内径 22 mm の大型試験管に、表 1 に示した無機塩培地を各 10 ml 分注し、炭素源としてウレタン化合物 I～V のウレタン化合物をそれぞれ約 0.1 g 添加した後、121℃で 20 分間滅菌したものをスクリーニング培地とした。培地調製に使用した試薬類はいずれも和光純薬工業社製の特級又はそれに準ずるものを用いた。

表 1 スクリーニング用培地

	組成	g/l
20	KH_2PO_4	0.6
	K_2HPO_4	1.6
	NH_4NO_3	1.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
25	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01
	ビタミン混合物	
	pH 7.0	

5	**ビタミン混合物	
	組成	終濃度 mg/l
	ニコチンアミド	10
	Ca-パントテン酸	2.5
	チアミン HCl	2.5
	リボフラビン	1.25
	ピリドキシン	0.75
	p-アミノベンゾエート	0.6
	葉酸	0.5
	ビオチン	0.1

スクリーニング

- 10 日本各地から収集した土壌 350 サンプルをスクリーニング源とした。ウレタン化合物 I ~ V それぞれに対して 50 本、計 250 本の試験管を用いた。土壌 20 サンプルずつを混合して得た土壌サンプルを、上述のスクリーニング培地の入った試験管 1 本につき 0.2 g 添加した。これを 30℃、125 osc/min で振盪培養し、1 週間毎に上清 0.5 ml を新たなスクリーニング用培地に移した。
- 15 この操作を 3 回繰り返した後、培養液中に白濁や変色が認められた 26 本の試験管サンプルについて、培養上清を生理食塩水で希釈して NB 平板培地上に塗布し、30℃で 1~3 日培養後、生育してきたコロニーを一つずつピックアップした。これらをウレタン結合分解菌の候補菌株とし、NB 平板培地で 30℃にて培養後、菌体を 20% グリセロール溶液に懸濁し、-80℃で凍結保存した。
- 20 得られた候補株を、ウレタン化合物 I を炭素源として含んだスクリーニング用液体培地で 30℃、125 osc/min にて培養し、ウレタン化合物 I のウレタン結合加水分解産物であるトルエンジアミンの培養液中における生成を薄層クロマトグラフィにて確認した。培養上清 0.5 ml に等量の酢酸エチルを加えて抽出し、酢酸エチル層を薄層プレート (Merck 社製 Kieselgel 60 F₂₅₄) に 60 μl スポットした。展開溶媒には酢酸エチル、メタノール、水を 80:35:3 の比率で混合したものを使用した。標準物質としてトルエンジアミンを同様にスポットし、Rf 値、および UV 照射下においての吸収による黒色スポットの生成で確認した。その結果、ウレタン結合加水分解産物であるトルエンジアミンを生成した菌株が 1 株得られた。これを TB-60 株として -8
- 25

0℃にて凍結保存した。尚、本菌株は、化合物Iを用いたスクリーニング系より得られたものである。

実施例2 ウレタン結合分解菌TB-60株の同定

生理学的試験は一般的な方法に従って行った。同定にはBergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore: WILLIAMS & WILKINS Co., (1984)を参考にした。また、米国BIOLOG社製の微生物同定システム(Microlog 3)も使用した。16srDNAの配列決定と解析はダイレクトPCR法を用い、プライマーには真正細菌16SrDNAのほぼ全長を増幅することのできる27Fおよび1492Rのプライマーセットを使用した。

形態学的・生理学的諸性質試験

TB-60株に関する形態学的・生理学的諸性質試験の結果は表2に示した。本菌株はグラム陽性のコリネ型細菌で、運動性はなく、孢子形成も見られなかった。また、本菌は非常に水分量の多い白色の半液体状コロニーを形成した。オキシダーゼ試験は陰性で、カタラーゼ試験は陽性、OF試験では陰性を示した。

表2 ウレタン分解菌TB-60株の菌学的諸性質

20	形態学的諸性質	形状 : コリネ型 グラム染色 : 陽性 孢子形成 : 形成しない 運動性 : なし コロニーの形態 : 白色、半透明、半液体状、不定形、拡散性
25	生理学的諸性質	酸素に対する態度 : 好氣的 チトクロームオキシダーゼ活性 : 陰性 カタラーゼ活性 : 陽性 O-F試験 : 陰性

BIOLOG同定システムによる同定

BIOLOG細菌同定システムを用いた同定試験の結果、本菌株は95%の確率でロドコッカス エクイと同定された。また、そのほかに50%以上の類似性を持つ菌種は見つからなかった。

5

表3 TB-60株のBIOLOGによる同定結果

	可能性 (%)
<i>Rhodococcus equi</i>	95
<i>Corynebacterium hoagii</i>	4
<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	0
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0

10

15

16S rDNA塩基配列

コロニーダイレクトPCRによって本菌株の16S rDNAのほぼ全長を増幅し、そのうちの上流領域535bp（配列番号1）と下流領域497bp（配列番号2）の塩基配列を決定した。

この配列に基づいてBLASTにより相同性検索を行ったところ、上流領域で98%、下流領域で100%の一致率でロドコッカス エクイと認められた。配列より求めた既知の菌種との系統樹を図2に示した。

以上の結果から、本菌株はロドコッカス エクイであると同定した。

実施例3 ロドコッカス エクイ TB-60株によるウレタン化合物分解試

25 験

供試菌株

ウレタン化合物分解菌として得られた、ロドコッカス エクイ TB-60株を用いた。

培地および試薬

実験には前述のスクリーニング用培地の他に、それから窒素源を除いた培地を使用し、ウレタン化合物 I を炭素源または炭素・窒素源として培養を行った。実験に用いた試薬類はすべて和光純薬製特級かそれに準ずるものを使用した。

培養条件

- 5 内径 16 mm の小型試験管に、ジエチルエーテルに溶解した 2 % ウレタン化合物 I を 0.1 ml ずつ分注し、ドラフト内でジエチルエーテルを十分に揮発させた後、培地 2 ml を加え、オートクレーブで 120℃ で 20 分間滅菌した。ロドコッカス エクイ TB-60 株を滅菌済み生理食塩水に $O.D._{660} = 0.2$ となるように懸濁したものを各試験管に 100 μ l 植菌し、30℃、300 rpm
- 10 m で 0 ~ 10 日間回転振盪培養を行った。実験は各 3 連で行い、無植菌のものをコントロールとした。

菌体生育量の測定

菌体生育量は、培養液の $O.D._{660}$ を吸光度計で測定した。吸光度の測定にはジャスコエンジニアリング社製の吸光度計 V-550 を用いた。

- 15 ウレタン分解量の測定

ウレタン化合物 I 残存量の測定は、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) にて行った。培養液にアセトニトリル 2 ml を加え、よく攪拌した後 20 分間静置し、上清をマイクロチューブに移して 12,000 rpm、4℃ で遠心し、さらにその上清を 2 ml 容のバイアル瓶に移し、各 10 μ l を試料として HPLC に

20 供した。カラムには東ソー社製 TSK-GEL ODS-80TM 4.6 mm \times 15 cm を用い、移動相には 70 % アセトニトリル、流速 0.6 ml/min で分析を行った。検出器には UV (240 nm) を用いた。

ジアミン生成量の測定

- ウレタン結合の分解に伴って生成するトルエンジアミン量は、ガスクロマトグラフィ (GC) にて定量した。培養終了後、培養上清 0.5 ml をマイクロチューブに移し、内部標準物質としてジフェニルアミン 100 ppm を含む酢酸エチル溶液 0.5 ml を加え 10 分間よく攪拌した。これを 12,000 rpm、4℃ で遠心した後、上層を新しいマイクロチューブに移し、約 80 mg の無水硫酸ナトリウムを加えて水分を除去したものを試料として各 2 μ l を GC に供した。G
- 25

C分析には島津製作所製のGC-2010を使用し、ジフェニルアミンを内部標準として濃度を算出した。カラムにはJ & W社製DB-1 (0.25mm×30m)を用い、カラム温度180℃、インジェクター温度300℃、検出にはFIDを用いた。

5 結果

各培養条件におけるウレタン化合物I残存量の測定結果を図3に示した。ウレタン化合物Iを炭素源として与えた系では培養開始10日でウレタン化合物Iの約6割が減少した。一方、炭素・窒素源として与えた培地においては、ウレタン化合物Iの減少は観察されたものの、その減少量は少なかった。

10 ジアミン生成量

ジアミン生成量の測定結果を図4に示した。ウレタン化合物Iを炭素源として与えた系では10日間の培養で約150ppmのトルエンジアミンの生成が認められた。一方、炭素・窒素源として与えた培地においては培養初期に顕著なジアミンが生成は認められたものの、その後の生成量はわずかであった。

15 菌体生育量

菌体生育量の測定結果を図5に示した。ウレタン化合物Iを炭素源として与えた系では培養初期に顕著な生育が認められた。一方で炭素・窒素源として与えた培地においては3日目以降も緩やかな増殖が認められた。

産業上の利用可能性

- 20 本菌株の純粋培養系を用いたウレタン化合物、特にポリウレタンの集約的分解処理、土壌中やコンポスト中に添加することによる分解処理や肥料として再資源化等への応用が期待される。また、本菌株は細菌であり、一般的に細菌のほうが大量培養が容易であるため、微生物分解処理にはコスト面で有利である点からも有用である。ウレタン中のエステル結合分解菌であるペニバチルスアミロリチカ
- 25 スTB-13株またはコマモナスアシドボランズTB-35株と本発明の微生物を共存させることにより、ポリウレタンの細菌による完全分解が可能となる。

請求の範囲

1. ロドコッカス属に属し、ウレタン結合分解能を有する微生物、またはその変異株。
2. ロドコッカス属に属する微生物がロドコッカス エクイである、請求項 1 記載の微生物。
3. ロドコッカス エクイに属する微生物がロドコッカス エクイ TB-60 株である、請求項 2 記載の微生物。
4. 請求項 1～3 の何れか一項に記載の微生物をウレタン化合物と接触させる工程を含む、ウレタン化合物の分解方法。
5. ウレタン化合物がポリウレタンの製造原料となる化合物である、請求項 4 記載の分解方法。
6. ウレタン化合物がポリウレタンである、請求項 4 記載の分解方法。
7. ポリウレタンの分解方法であって、
ポリウレタンと請求項 1～3 の何れか一項に記載の微生物を接触させる工程、および
ポリウレタンとポリウレタンのエステル結合分解能を有する微生物を接触させる工程、
を含む、前記ポリウレタンの分解方法。
8. ポリウレタンのエステル結合分解能を有する微生物が、ペニバチルスアミロリチカス TB-13 株またはコマモナスアシドボランス TB-35 株である、請求項 7 記載の方法。

図 1

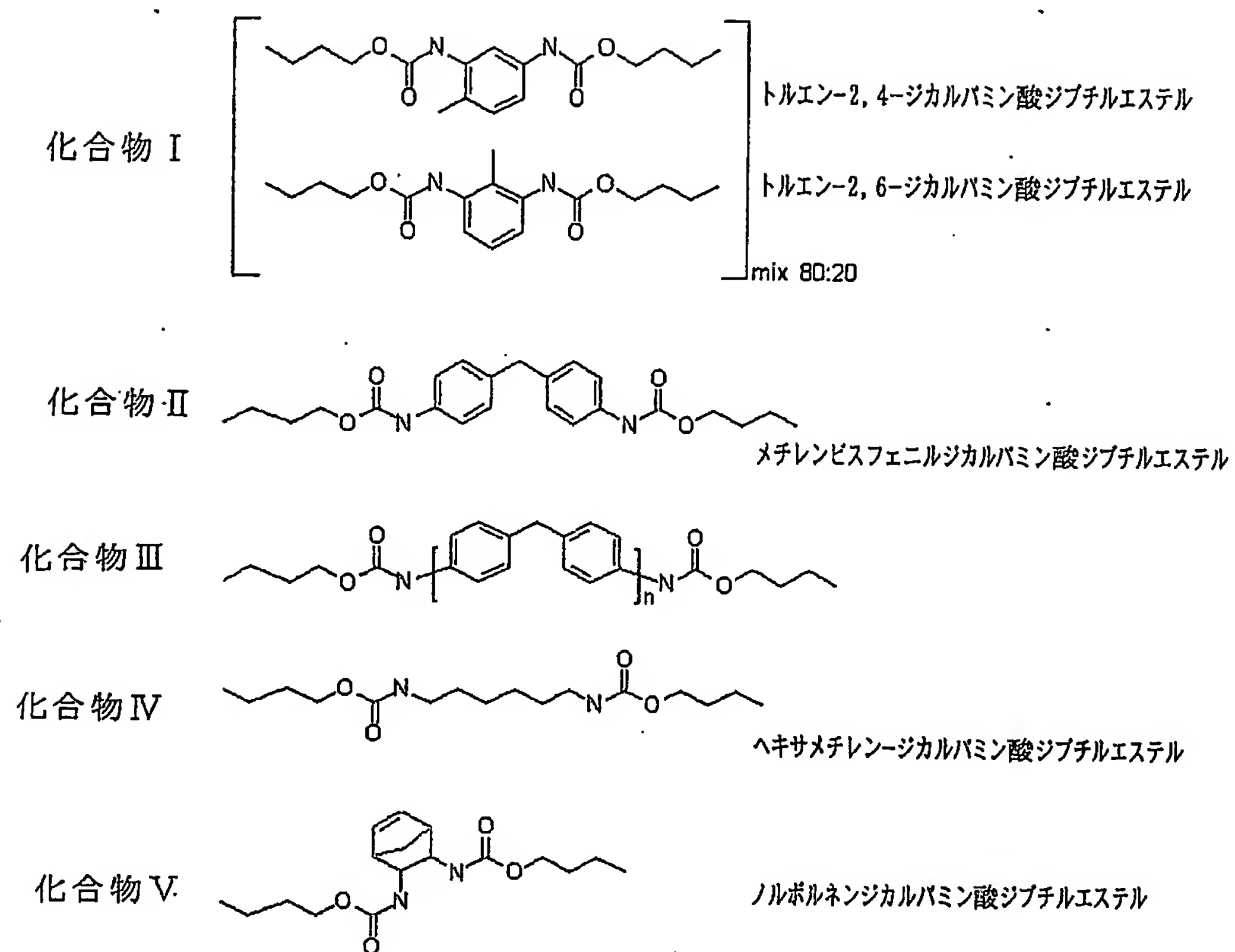


図 2

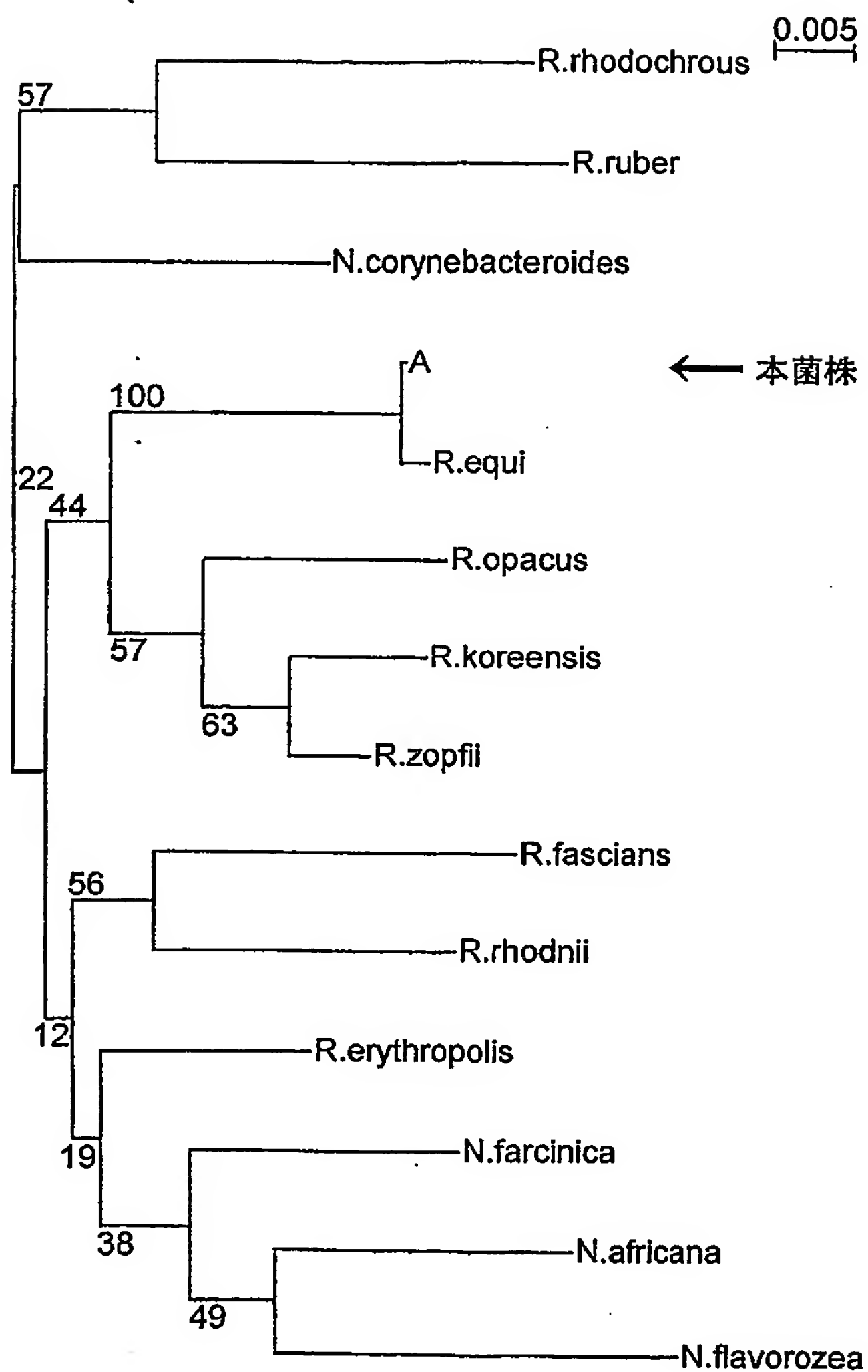


図 3

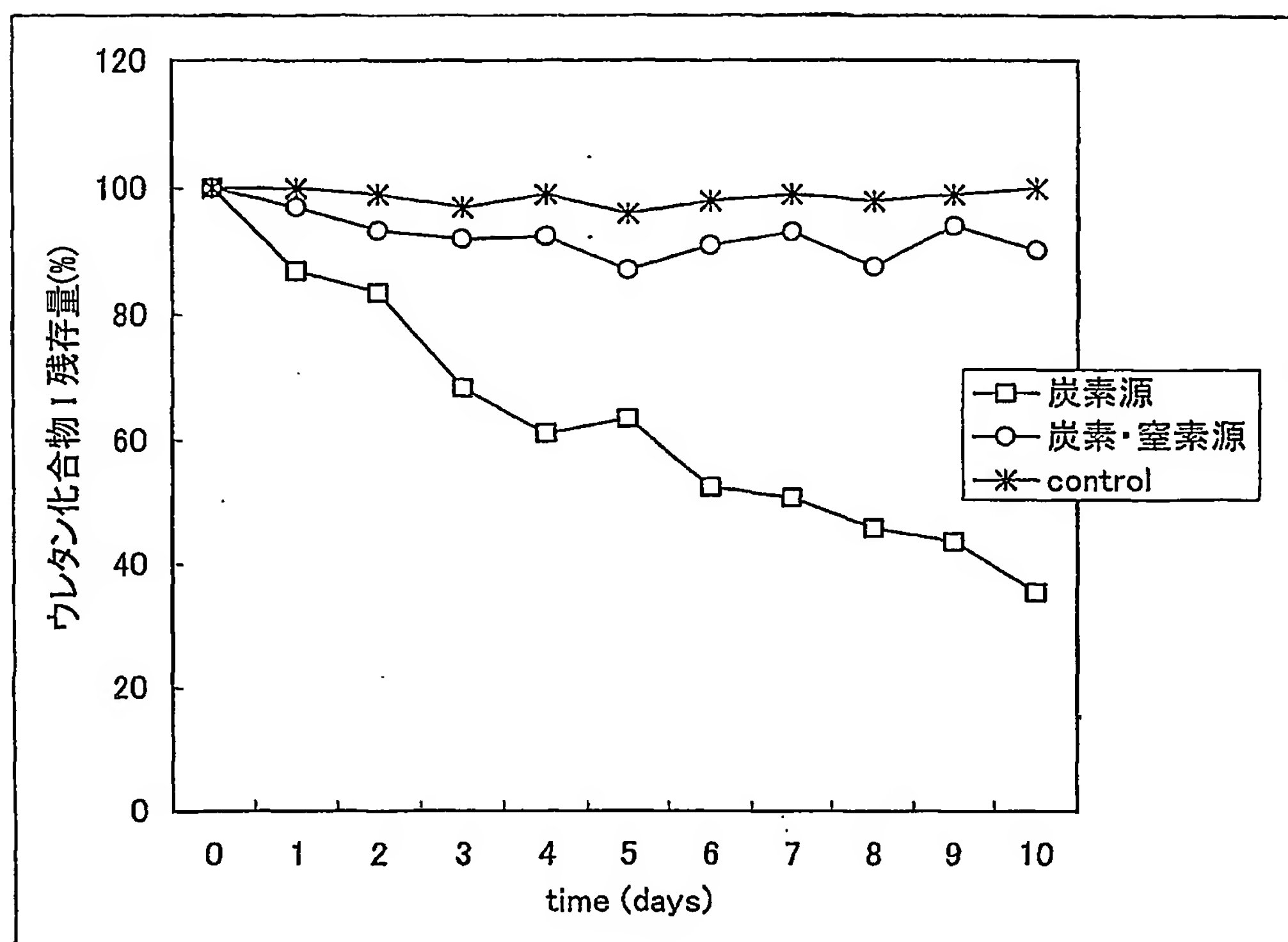


図 4

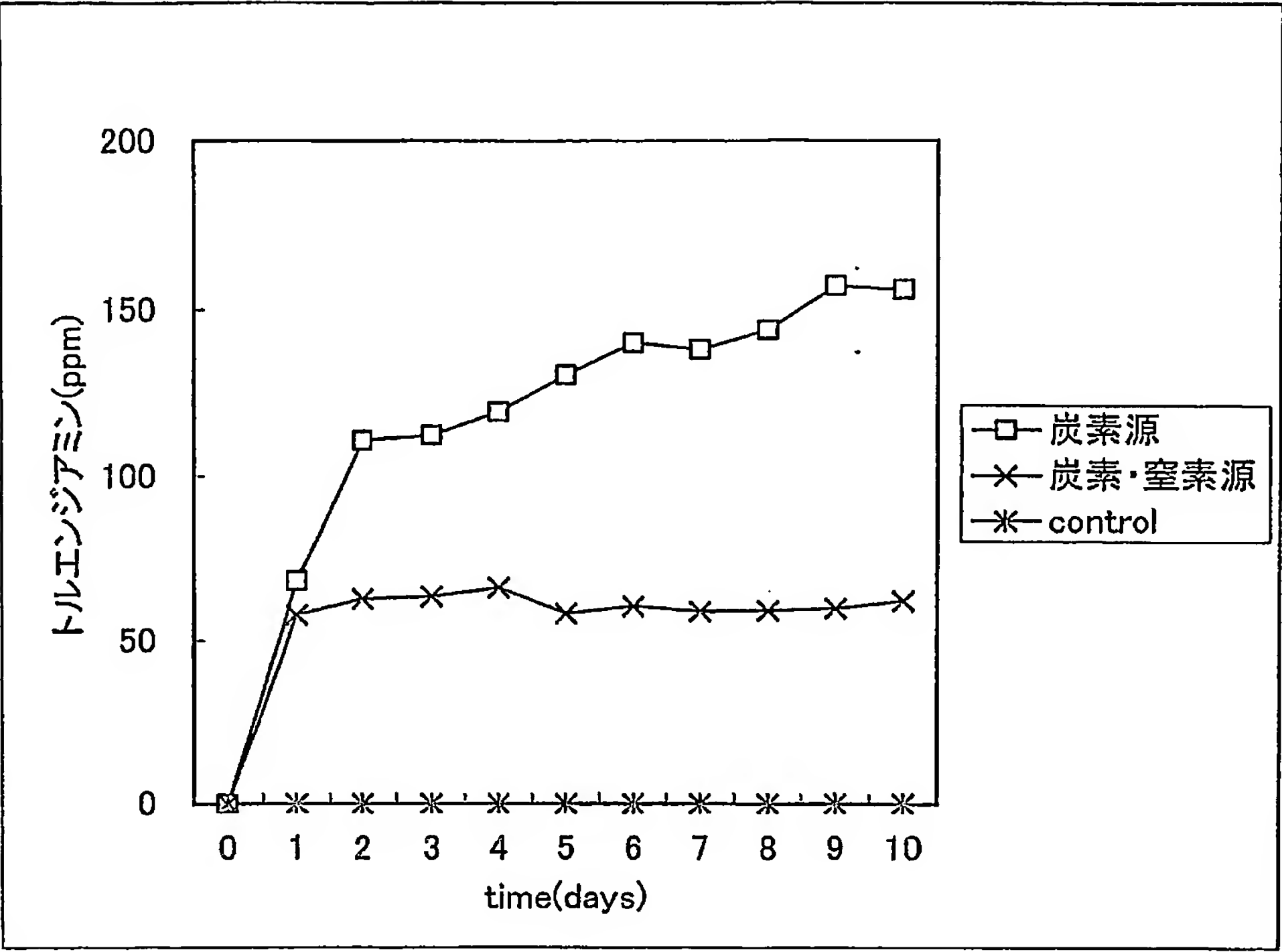
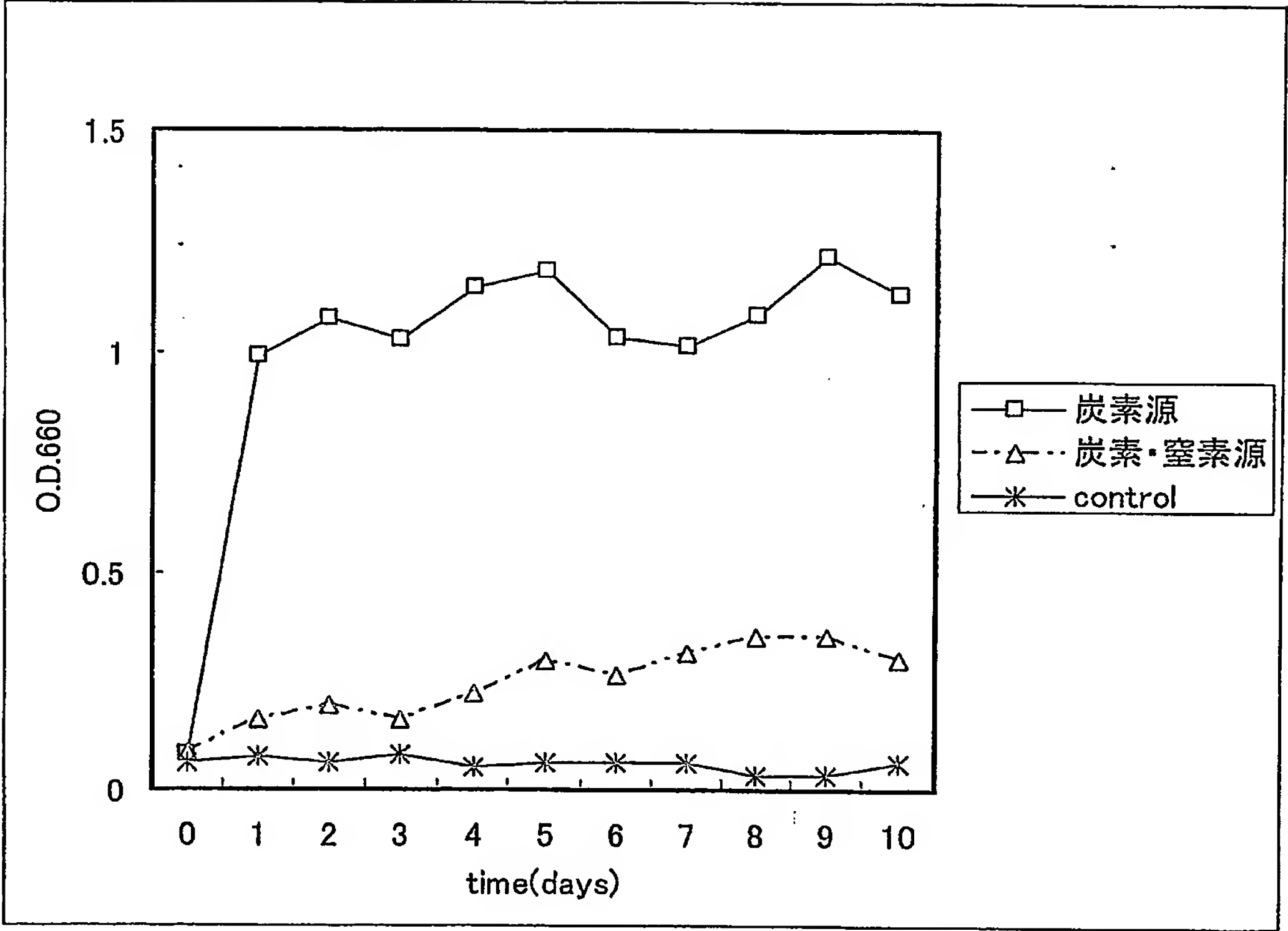


図 5



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

5

<120> Novel urethane-bond-degrading bacterium

<130> 022987

10 <160> 2

<210> 1

<211> 535

<212> DNA

15 <213> Rhodococcus equi TB-60

<400> 1

tagagittga tcctggctca ggacgaacgc tggcggcgtg citaacacat gcaagtcgag 60
cggtaaggcc citcggggta cacgagcggc gaacgggtga gtaacacgtg ggtgatctgc 120
20 cctgcactct gggataagcc tgggaaacig ggtctaatac cggatatgag ctcctgtcgc 180
atggcggggg ttggaaaggt ttactggcgc aggatgggcc cgcggcctat cagcttgttg 240
gtggggtaat ggcctaccaa ggcgacgacg ggtagccggc ctgagagggc gaccggccac 300
actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa 360
tgggcgaaag cctgatgcag cgacgccgcg tgagggatga cggccttcgg gttgtaaacc 420
25 tctttcagca gggacgaagc gaaagtgcg gtacctgcag aagaagcacc ggccaactac 480
gtgccagcag cccgcggtaa tacgtagggt gcgagcgttg tccggaatta ctggg 535

<210> 2

<211> 497

<212> DNA

<213> Rhodococcus equi TB-60

5 <400> 2

ccttgtggtc ggtatcacagg tggatcatgg ctgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg 60
gttaagtcgc gcaacgagcg caacccttgt cctgtgttgc cagcgcgtaa tggcggggac 120
tcgcaggaga ctgccgggggt caactcggag gaaggigggg acgacgtcaa gtcatcatgc 180
cccttatgtc cagggttca cacatgttac aatggccggt acagagggt gcgataccgt 240
10 gaggtggagc gaatccctta aagccggtct cagtctggat cggggtctgc aactcgaccc 300
cgtgaagtcg gaticgctag taatcgcaga tcagcaacgc tgcggtgaat acgttcccgg 360
gccttgtaca caccgcccgt cactcatga aagtcggtaa caccgaagc cgttggccta 420
acccttgttg agggagccgt cgaaggtagg atcggcgatt gggacgaagt cgtaacaagg 480
tagcctcagt cagtcac 497

15